

ПЦР-ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS*

Ю.Н. Горовик, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – важная лесообразующая порода. Бактериальные и грибные заболевания этого древесного растения наносят значительный вред лесным хозяйствам во всем мире.

Из образцов сосны с симптомами бактериозов нами были выделены бактерии *Bacillus pumilus* способные заражать проростки и ветки *P. sylvestris* [1]. Существуют публикации, свидетельствующие о том, что считавшийся ранее исключительно сапротрофным, данный вид микроорганизмов может вызывать заболевания растений. Бактерии *B. pumilus* были выделены при бактериозах сельскохозяйственных культур: персика, манго, картофеля, фасоли и имбиря [2–6]. В связи с ростом числа бактериозов, вызванных *B. pumilus*, актуальной задачей становится создание системы быстрой диагностики этого патогена. Для решения этой задачи эффективно используется полимеразная цепная реакция с видоспецифическими праймерами.

Целью данной работы являлась разработка системы ПЦР-диагностики бактерий *B. pumilus* на основе праймеров к гену целлюлазы.

Методы исследования

Штаммы бактерий, использованные в работе, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Штаммы бактерий, использованные в работе

Вид бактерии и штамм	Источник	Наличие ПЦР-продукта с праймерами Вр-1 и Вр-2
1	2	3
<i>B. pumilus</i> P10	Сосна	+
<i>B. pumilus</i> P107	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P109	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P110	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P113	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P115	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P120	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P123	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P135	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P140	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P142	- « -	+
<i>B. pumilus</i> P144	- « -	+
<i>B. pumilus</i> 22.1 ¹	Огурец	+
<i>B. pumilus</i> 36.2 ¹	Огурец	+
<i>B. pumilus</i> 33.5 ¹	Томат	+
<i>B. pumilus</i> 24.1 ¹	Томат	+
<i>B. licheniformis</i> P2 свободноживущий	Сосна	-
<i>Bacillus</i> sp. P1 свободноживущий	Сосна	-
<i>Raenibacillus</i> sp. P26 свободноживущий	Сосна	-
<i>B. subtilis</i> 9Bs72 ¹ свободноживущий	Почва	-
<i>B. cereus</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>B. megaterium</i> ¹ свободноживущий	—	-

Продолжение таблицы 1		
1	2	3
<i>B.idosus</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>B. mycoides</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>B. polymyxa</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>B. thuringiensis</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>Pseudomonas putida</i> ¹ свободноживущий	—	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> JMB2290 ¹ фитопатоген	Томат	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 2.5 ¹ фитопатоген	Крестоцветные	-

Примечание: ¹ – микроорганизм из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ;
² – микроорганизм из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ; «—» – сведения отсутствуют.

B. pumilus культивировали на картофельном агаре, остальные микроорганизмы – на питательном агаре. Также для выращивания бактерий использовали питательный бульон.

Выделение общей ДНК из бактерий проводили с применением саркозила, как описано у Брона [7]. Электрофорез в агарозном геле и рестрикцию проводили по стандартным методикам, описанным в руководстве Т. Манниатиса [8].

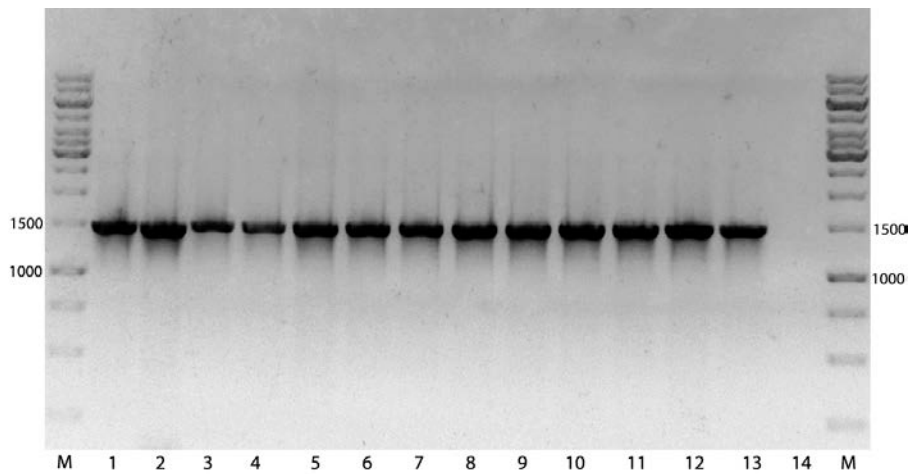
ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав смеси: 0,5 пМ каждого праймера, 0,2 ед. Taq ДНК-полимеразы, по 0,2 мМ дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, 10 мМ сульфата аммония, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 2 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, Tween 20 0,02%, по 1 мкл общей ДНК либо суспензии клеток различной концентрации, либо дистиллированной воды (отрицательный контроль). Параметры амплификации: 1 цикл 94°С 3 мин, если матрица – ДНК, либо 8 мин, если матрица – суспензии клеток; 30 циклов 94°С 30 с, 52°С 30 с, 72°С 2 мин; 1 цикл 72°С 5 мин. В работе был использован амплификатор Px2 Thermal Cycler (ThermoHybaid). Продукты амплификации разделялись в 1% агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Ранее из образцов сосны с симптомами бактериозов были выделены несколько изолятов потенциально фитопатогенных бактерий. Наибольший интерес вызвал изолят P10, идентифицированный по физиолого-биохимическим критериям и последовательности гена 16S рРНК как *B. pumilus*. В опытах по искусственному заражению сосны он вызвал ярко выраженные симптомы: опухоли и некроз на стеблях, а также некроз хвои [1].

Для создания праймеров использовались последовательности девяти генов целлюлаз *B. pumilus* из электронных баз данных (gb|JN887465.1, gb|AF206716.1, gb|EU665192.1, gb|JN681277.1, gb|EF093188.1, gb|EF620915.1, dbj|AB004098.1, gb|NM572322.1, gb|EF501975.1). В программе MEGA [9] было произведено выравнивание вышеупомянутых последовательностей. На основе консервативных участков были подобраны последовательности прямого (Bp-1 TCAAATCAAGTGGGCAAC) и обратного (Bp-2 GAGGCATCCCATATATTTCG) праймеров.

Путем моделирования ПЦР с праймерами Bp *in silico* определили размер ПЦР-продукта в 1461 п.н. На рисунке 1 представлена электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных в реакции с праймерами Bp, где в качестве матрицы была общая ДНК штамма *B. pumilus* P10 и еще 12 штаммов, схожих с ним по морфологическим и биохимическим критериям.

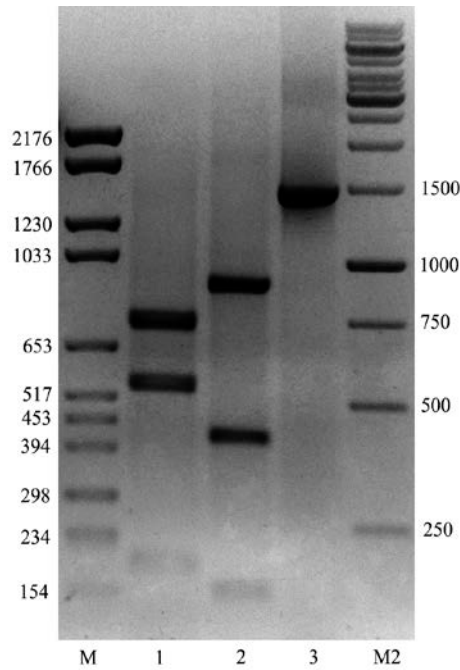


Штаммы *B. pumilus*: 1 – 36.2; 2 – P10; 3 – P107; 4 – P109; 5 – P110; 6 – P113; 7 – P115; 8 – P120; 9 – P123; 10 – P135; 11 – P140; 12 – P142; 13 – P144; 14 – отрицательный контроль. М – маркерная ДНК (1 kb DNA ladder mix, Fermentas)

Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров Вр-1 и Вр-2

Как видно из приведенных данных, в реакции получили единственный ПЦР-продукт, размером около 1500 п.н., что соответствует предсказанному. Всего в ПЦР с праймерами Вр было протестировано 15 штаммов, схожих с *B. pumilus* по биохимическим свойствам и выделенных из растений. Во всех случаях получался единственный ПЦР-продукт.

Путем моделирования *in silico* нами были подобраны две рестриктазы, дающие специфический набор фрагментов при разрезании ПЦР-продуктов, полученных с праймерами Вр. Этими рестриктазами (*Cla* I и *Pvu* II) был обработан ПЦР-продукт из штамма *B. pumilus* P10. Данные рестрикции представлены на рисунке 2.



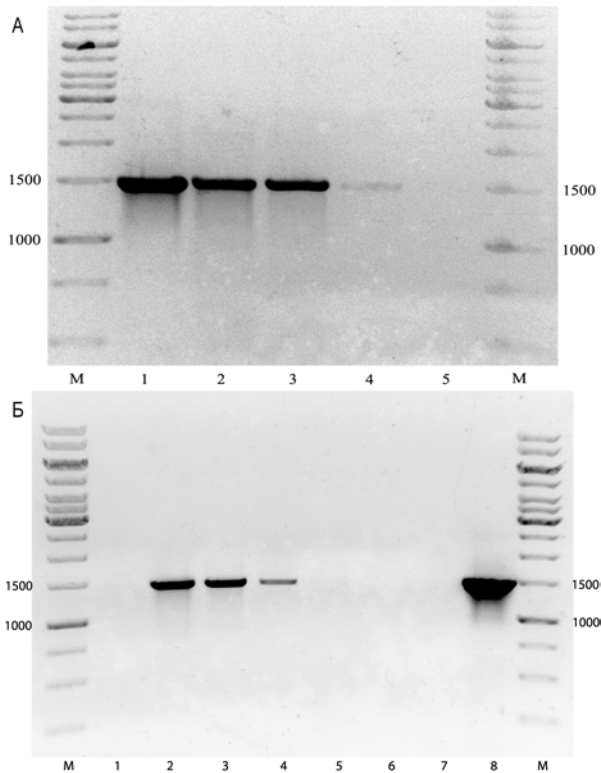
1 – фрагменты, полученные после обработки рестриктазой *Cla* I; 2 – фрагменты полученные после обработки рестриктазой *Pvu* II; 3 – неразрезанный ПЦР-продукт; М – маркерная ДНК (Marker VI, Roche); M2 - маркерная ДНК 2 (1 kb DNA ladder mix, Fermentas)

Рисунок 2 – Электрофореграмма фрагментов ДНК полученных путем рестрикции ПЦР-продукта из штамма *B. pumilus* P10

Размер полученных продуктов рестрикции примерно соответствует предсказанному, что подтверждает, что ПЦР-продукт получен путем амплификации гена целлюлазы *B. pumilus*.

Специфичность праймеров Вр проверялась на других представителях рода *Bacillus*, а также на некоторых фитопатогенных и сапротрофных грамотрицательных бактериях (таблица 1). Ни один из использованных в тестах на специфичность микроорганизмов не дал ПЦР-продукта с праймерами Вр, за исключением штамма *B. pumilus* P10, служившего контролем. Исходя из наших данных о специфичности праймеров Вр, можно сделать вывод, что штаммы от P107 до 24.1 из таблицы 1 относятся к виду *B. pumilus*.

Чувствительность реакции с праймерами Вр определялась как на ДНК, так и на клетках *B. pumilus*. В первом случае в ПЦР добавлялось известное количество ДНК штамма P10: от 100 до 0,1 нг. На рисунке 3 А приведена электрофореграмма этой реакции.



А – использование в качестве матрицы ДНК штамма P10: 1 – 100 нг; 2 – 10 нг; 3 – 1 нг; 4 – 0,1 нг; 5 – отрицательный контроль. Б – использование в качестве матрицы суспензий клеток *B. pumilus* P10: 1- 10^6 кл/мкл; 2 – 10^5 кл/мкл; 3 – 10^4 кл/мкл; 4 – 10^3 кл/мкл; 5 – 10^2 кл/мкл; 6 – 10^1 кл/мкл; 7 – отрицательный контроль 8 – положительный контроль (100 нг ДНК *B. pumilus* P10); М – маркерная ДНК (1 kb DNA ladder mix, Fermentas)

Рисунок 3 – Электрофореграммы тестов на чувствительность ПЦР с праймерами Вр

Как видно из рисунка 3 А, за 30 циклов ПЦР стабильно детектируется 1 нг ДНК на реакцию. В случае с клетками в качестве матрицы первоначально удавалось обнаружить лишь 10^6 кл/мкл. Такой результат может объясняться тем, что грамположительные клетки хуже разрушаются с высвобождением ДНК под действием температуры. Так, например для представителя грамотрицательных бактерий – *Erwinia amylovora* чувствительность ПЦР на клетках составляет 10^1 КОЕ на реакцию [10]. А для грамположительной бактерии *B. cereus* чувствительность ПЦР на клетках – 10^3 КОЕ на реакцию, то есть в 100 раз меньше, чем для грамотрицательных бактерий [11]. Чтобы повысить выход ДНК в ходе ПЦР, мы решили увеличить время предварительно нагрева, а также добавляли различные детергенты в реакционную смесь: саркозил, Triton X100 и Tween 20. Наилучших результатов удалось добиться при добавлении в ПЦР буфер Tween 20 до 0,02% и предварительным нагревом

реакционной смеси до 94°C в течении как минимум 8 минут. В таком случае стабильно детектировались 10^3 КОЕ на реакцию (Рисунок 3 Б), как и для *B. cereus*.

Выводы

В ходе работы была подобрана пара праймеров – Вр-1 и Вр-2, с помощью которых амплифицируется участок внутри гена целлюлазы *B. pumilus*. Специфичность праймеров оказалась абсолютной на выборке из 10 представителей близкородственных видов *Bacillus* и *Paenibacillus*, а также 5 видов грамотрицательных свободноживущих и фитопатогенных бактерий. Чувствительность метода такова, что позволяет определить 1 нг ДНК либо 10^3 КОЕ *B. pumilus* на реакцию. С помощью данных праймеров удалось идентифицировать *B. pumilus*, выделенных из растений сосны, томатов и огурцов.

Список литературы

1. Горовик, Ю.Н. *Bacillus pumilis* – новый фитопатоген сосны обыкновенной / Ю.Н. Горовик, А.Л. Лагоненко, А.Н. Евтушенков // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 194–198.
2. Saleh, O.I. *Bacillus pumilus*, the Cause of Bacterial Blotch of Immature Balady Peach in Egypt / O.I. Saleh, P. Huang, J. Huang // Journal of Phytopathology. – 1997. – Vol. 145, № 10. – P. 447–453.
3. Galal, A. *Bacillus pumilus*, A New Pathogen on Mango Plants / A. Galal, A. El-Bana, J. Janse // Egyptian Journal of Phytopathology. – 2006. – Vol. 34, № 1. – P. 17 – 29.
4. Bathily, H. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on potato tubers in storage in Mali / H. Bathily, A.H. Babana, F. Samaké // African Journal of Microbiology Research. – 2010. – Vol. 4, № 20. – P. 2067–2071.
5. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain / M.I. Font et al. // Plant Pathology. – 2010. – Vol. 59, № 2. – P. 400–400.
6. Peng, Q. *Bacillus pumilus*, a Novel Ginger Rhizome Rot Pathogen in China / Q. Peng, Y. Yuan, M. Gao // Plant Disease. – 2013. – Vol. 97, № 10. – P. 1308–1315.
7. Bron, S. Plasmids / S. Bron // Molecular Biological Methods for Bacillus / Chichester – 1990. – P. 75–174.
8. Манниатис, Т., Фрич, Э. и Сэмбрук, Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Манниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. Москва: Мир, 1984. – 480 с.
9. Tamura, K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // Molecular biology and evolution. – 2007. – Vol. 24, № 8. – P. 1596–1599.
10. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers / R.K. Taylor et al. // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. – 2001. – Vol. 29, № 1. – P. 35–43.
11. Das, S. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood / S. Das, P.K. Surendran, N.K. Thampuran // The Indian journal of medical research. – 2009. – Vol. 129, № 3. – P. 316–320.